

# **Structure d'un locus de résistance à la rouille chez une espèce hautement polyploïde, la canne à sucre ( $2n \approx 12x \approx 115$ )**

Présenté par :

ZINI Cyrille

Directrice de thèse :

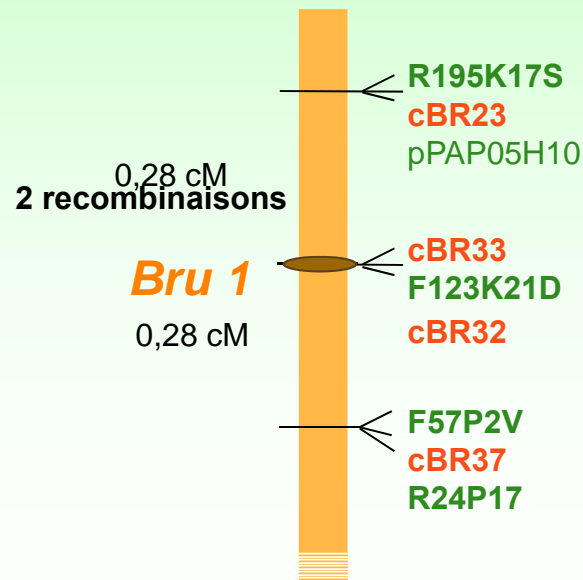
Angélique D'Hont

**Difficulté : seuls les marqueurs simples doses peuvent être utilisés.**

**Basée sur 700 descendants issus de l'autofécondation de R570.**

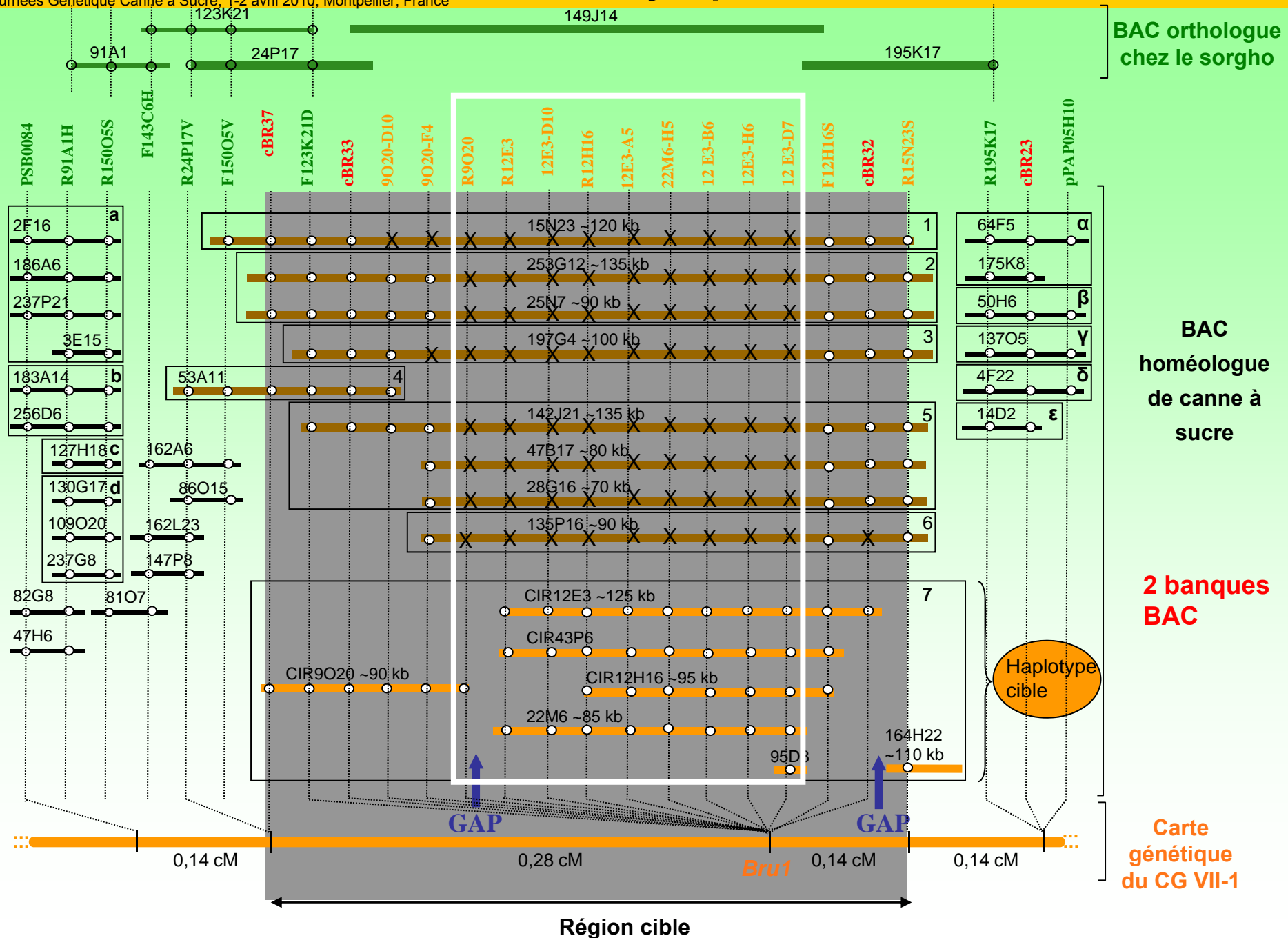
- **Exploitation de la synténie avec le riz et le sorgho.**
  - Région orthologue sur le chromosome 4 du sorgho.
  - Région orthologue sur le chromosome 2 du riz.

➔ **Obtention d'une carte génétique fine.**



# Carte Physique

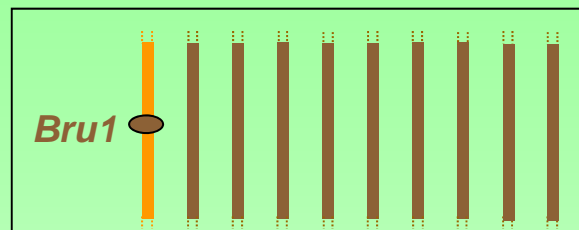
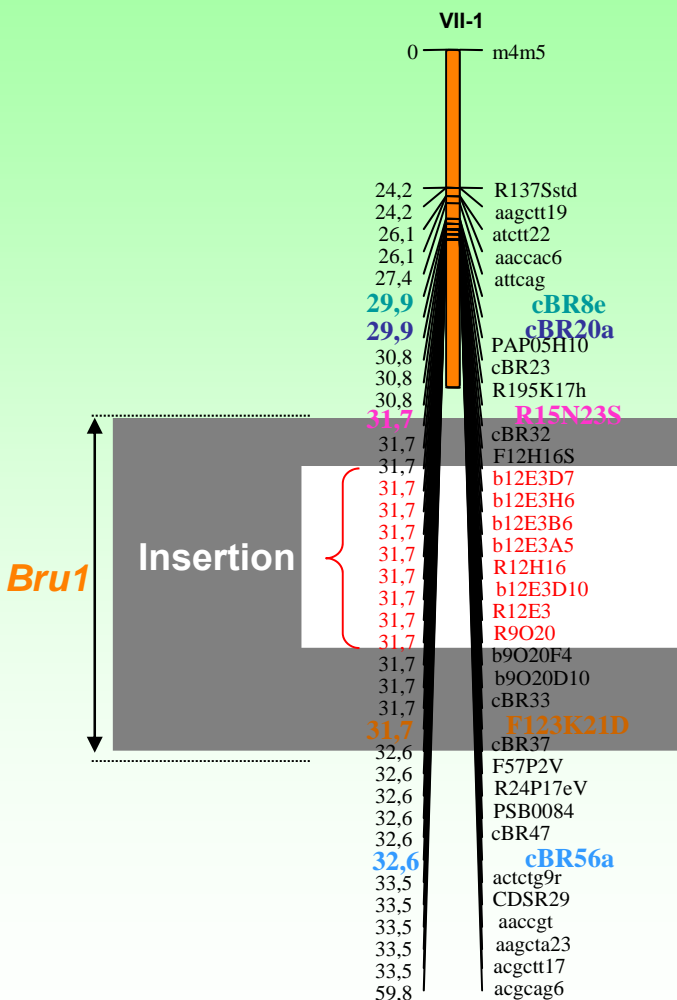
Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France



# Impact de l'insertion sur les recombinaisons

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France

## Carte génétique de R570 VII-1 (sur 112 individus)



Groupe  
d'homologie

Locus	Groupe VII-1	Groupe VII-b	Groupe VII-c	Groupe VII-d
cBR8-R15N23S	1.8cM	2cM	-	-
cBR20-R15N23S	1.8cM	1cM	-	-
cBR8-cBR56	2.4cM	-	-	10.3cM
cBR8-F123K21D	1.8cM	4.7cM	-	-
cBR20-F123K21D	1.8cM	3.7cM	7.2cM	-
R15N23S-F123K21D	0cM	2.7cM	-	-

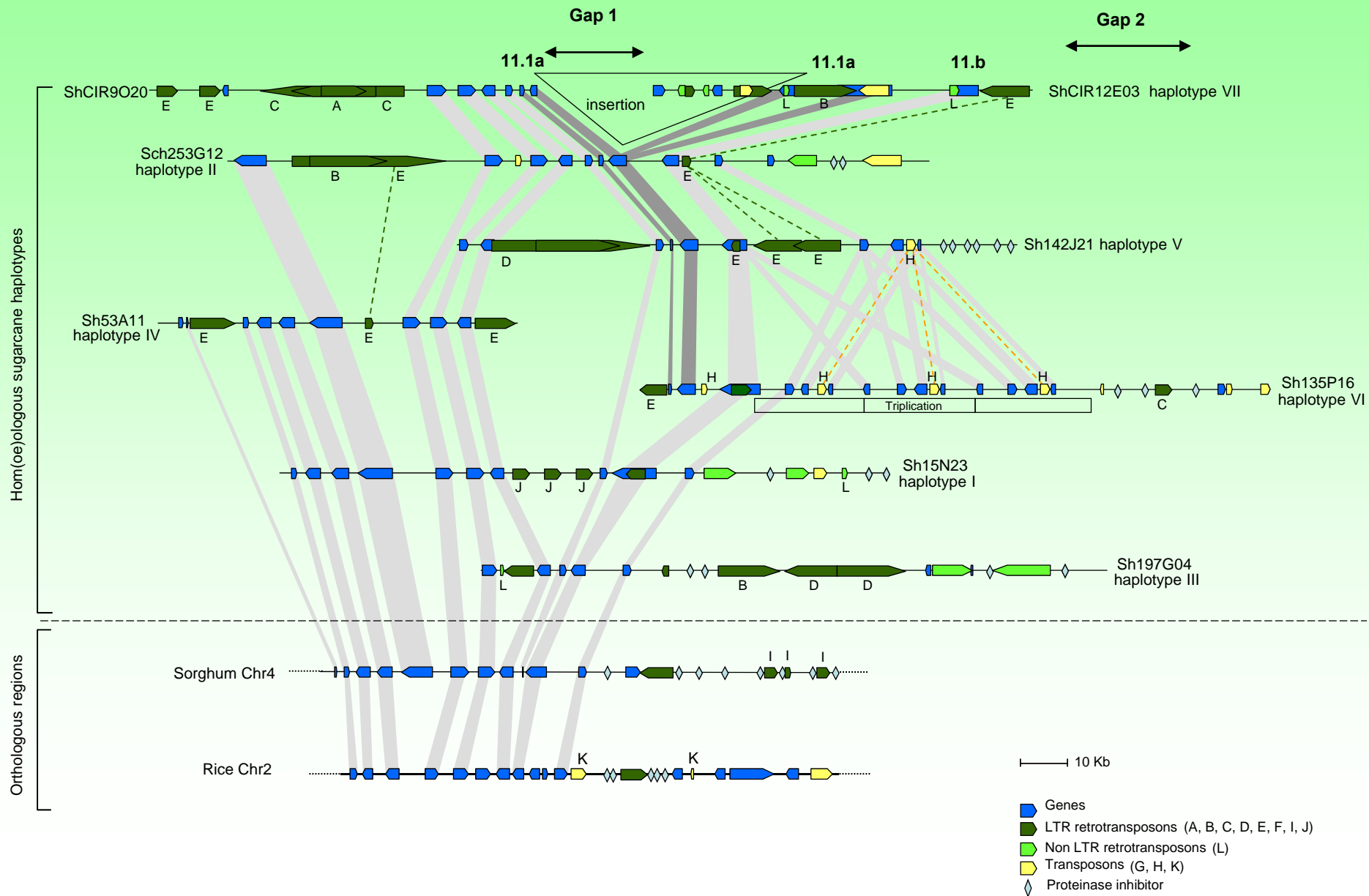
Insertion → Réduction des recombinaisons

2 000 nouveaux individus de l'autofécondation de R570  
criblés

→ Pas de nouveaux recombinants

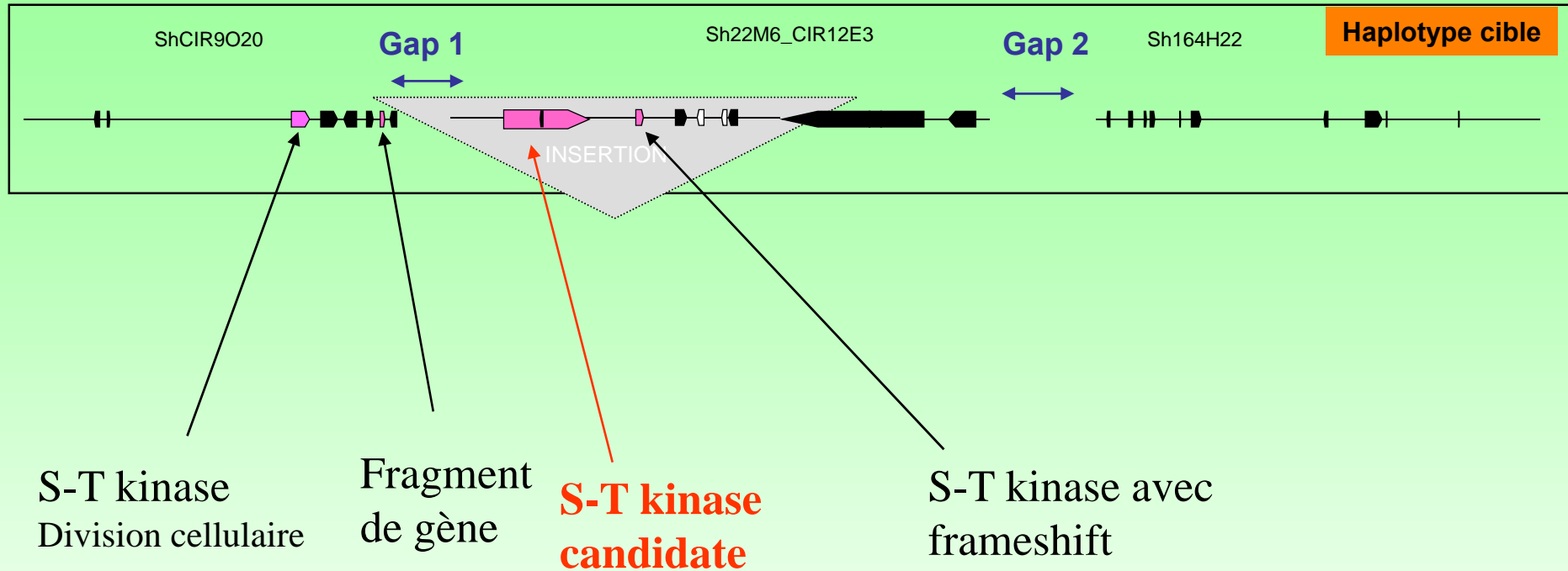
# Annotation des BAC et homologie de séquences

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France



# Identification des gènes candidats

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France



- . Homologie de séquence avec *Rpg1* de l'orge : gène de résistance à la rouille
- . 2 S/T Kinase en tandem
- . Résistance stable dans le temps comme *Bru1*.

- 1) Compléter la carte physique de la région de *Bru1*.
- 2) Tester les gènes candidats.

## - Essai de PCR Long range

. Définition d'amorces tests sur le BAC CIR 9O20 pour amplifier 5 Kb, 10 Kb, 20 kb.

➡ Témoin d'amplification de 10 Kb maximum sur BAC.

➡ Témoin d'amplification de 10 Kb maximum sur génomique.

. Définition d'amorces entourant l'espace entre les BAC CIR 9O20 et 22M6

➡ Pas d'amplification.



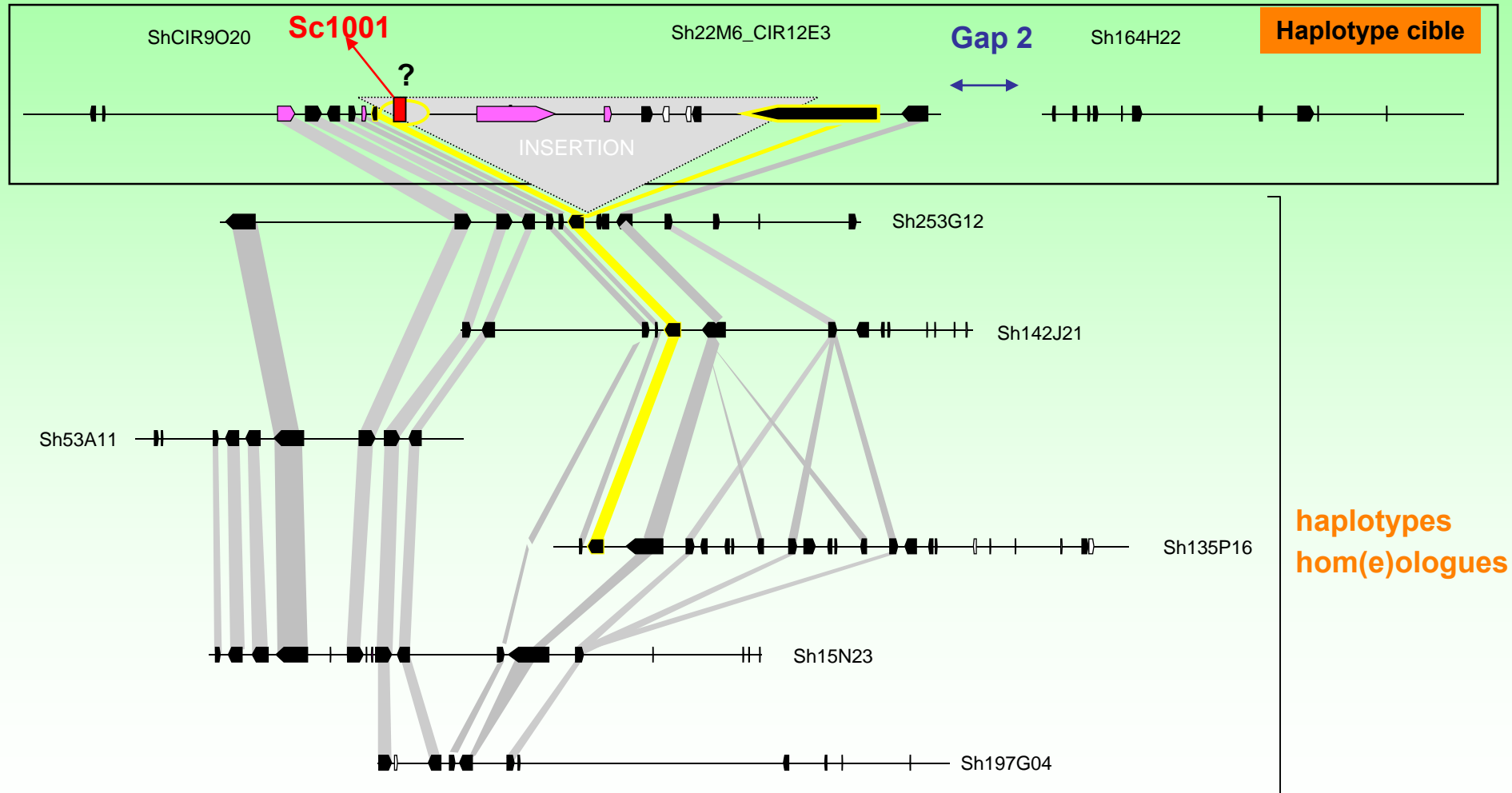
# Compléter la carte physique

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France

## - Espace entre CIR 9O20 et 22M6

. Gène NADP-dépendent D-sorbitol-6-phosphate déshydrogénase (S6PDH)

2 familles : S6PDH11.a (jaune) et S6PDH11.b (orange)



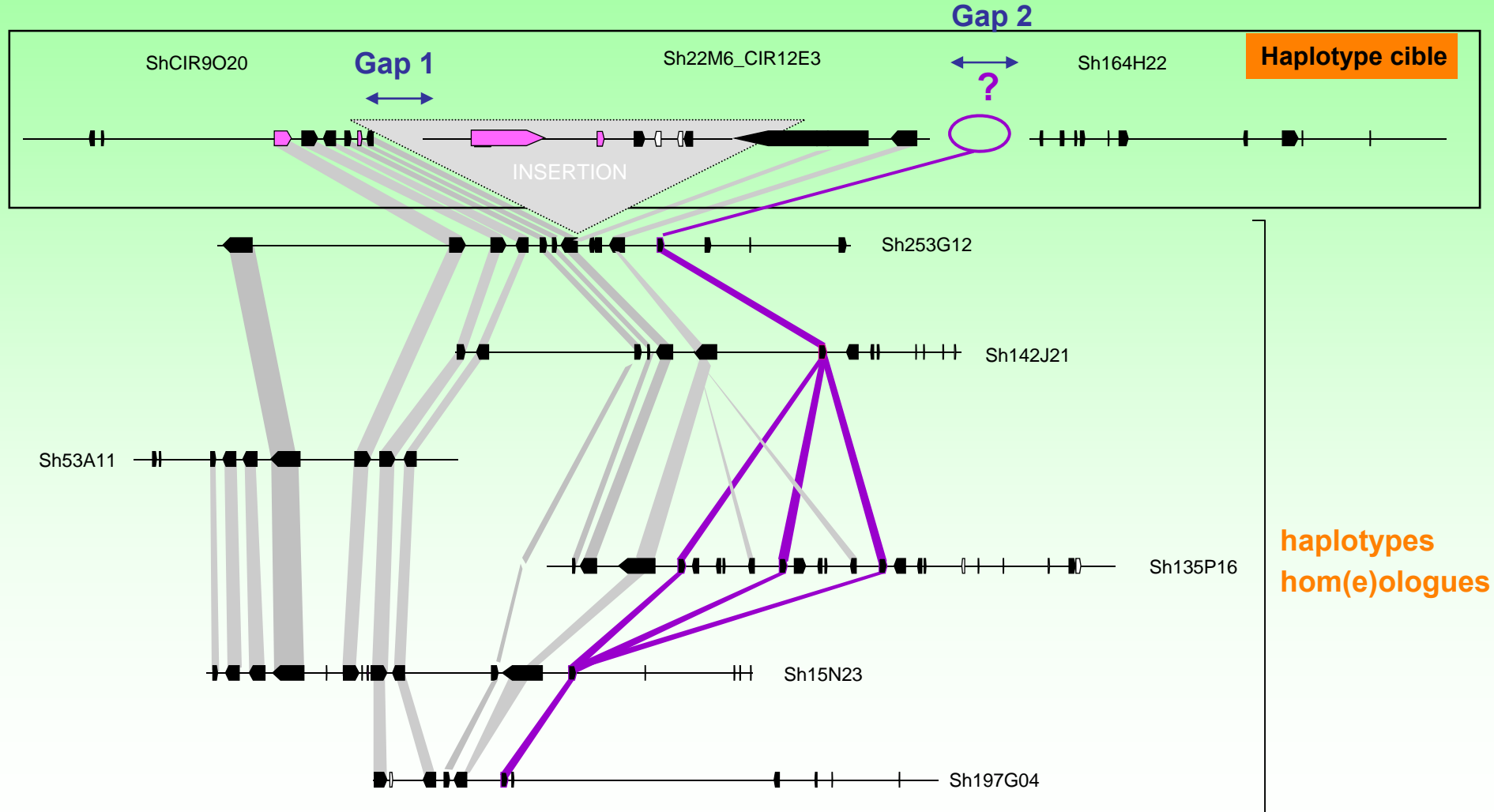
➡ Pas de nouveaux BACs identifiés appartenant à l'haplotype cible.

# Compléter la carte physique

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France

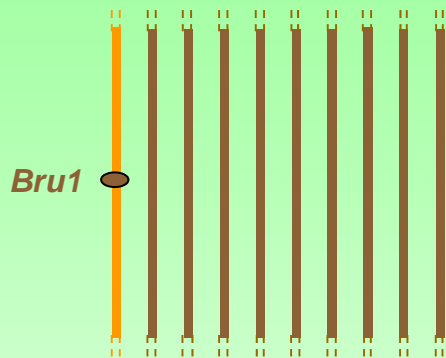
## - Espace entre CIR 12E3 et 164H22

Gène identifié comme étant une glucanase sur 5 haplotypes

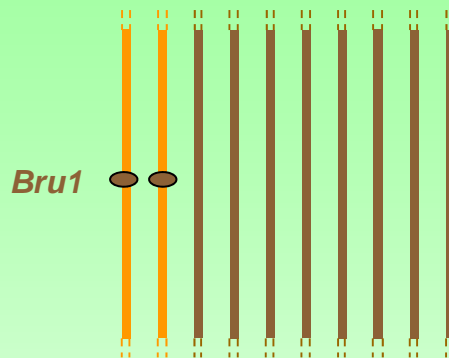


➡ Pas de nouveaux BACs identifiés appartenant à l'haplotype cible.

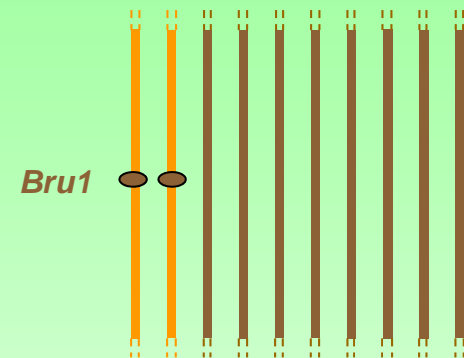
- Construction d'une nouvelle banque avec BamHI



Banque BAC Clemson HindIII  
103 000 BAC  
1.3 X



Banque BAC CIRAD HindIII  
110 000 BAC  
1.4 X



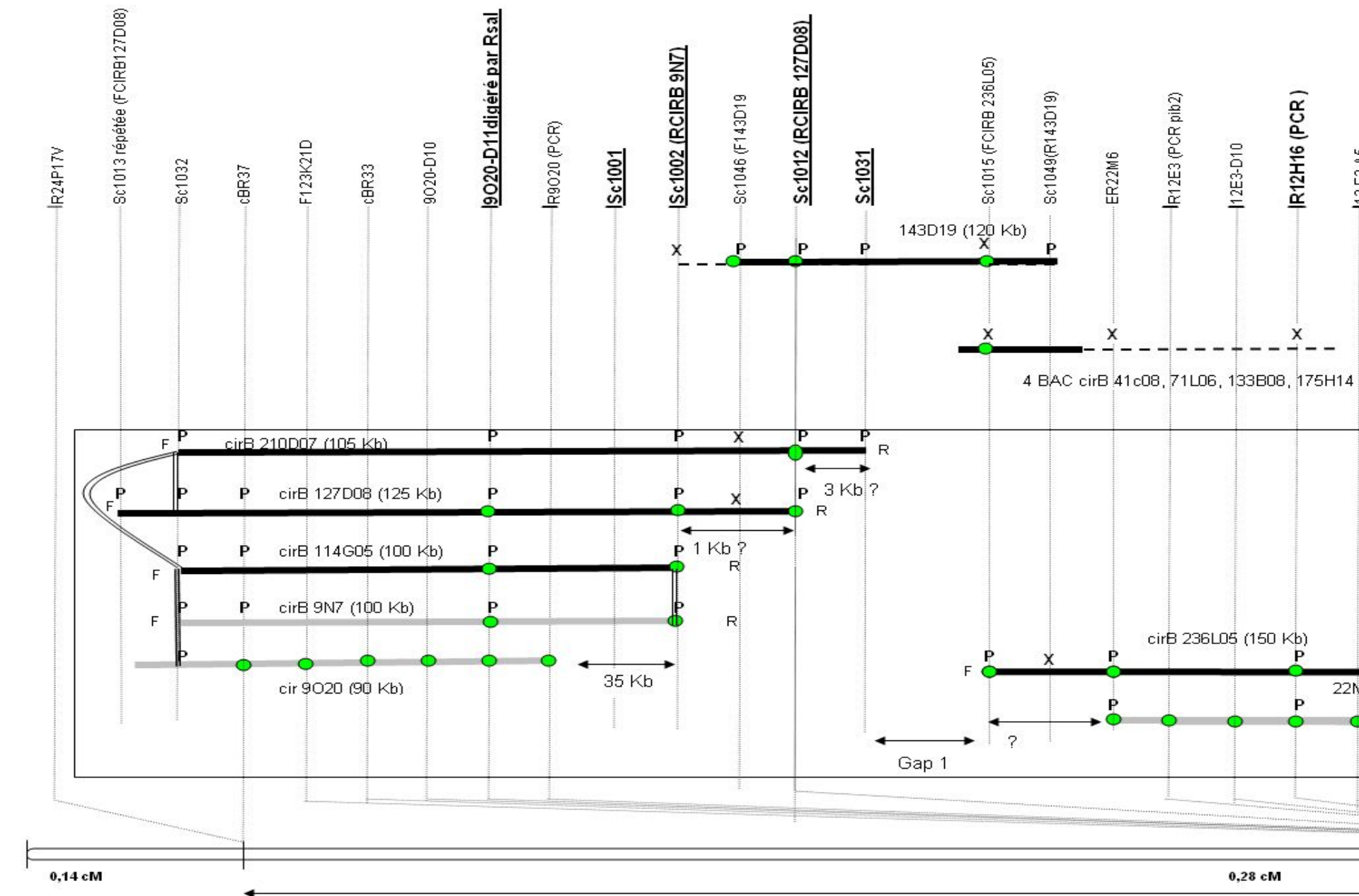
Banque BAC CIRAD BamHI  
120 000 BAC  
1,6 X

---

Recouvrement de la région cible

$$= 1,3X + 2(1,4X) + 2(1,6X) = 7.3 X$$

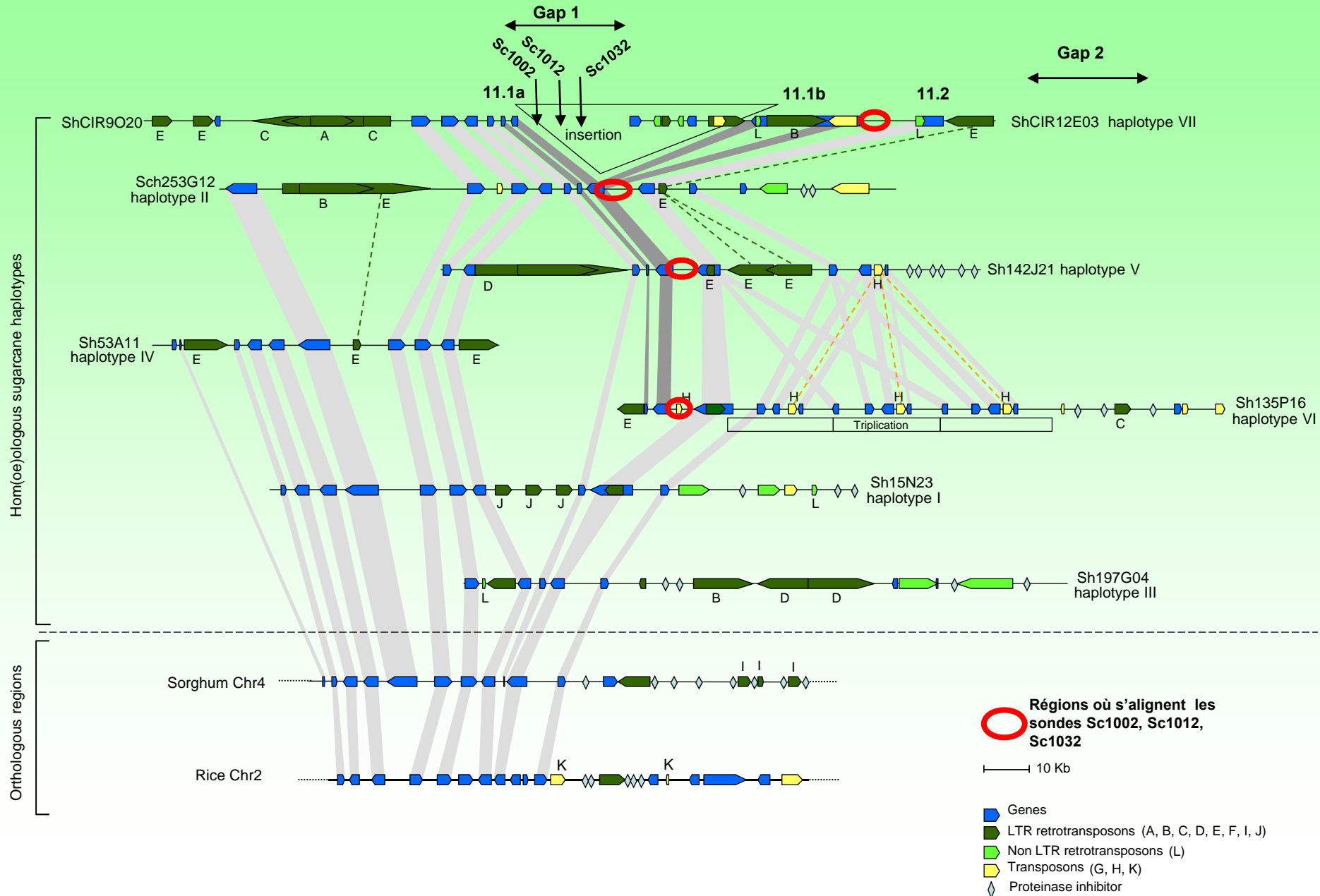
➡ 7 nouveaux BACs identifiés appartenant à l'haplotype cible.

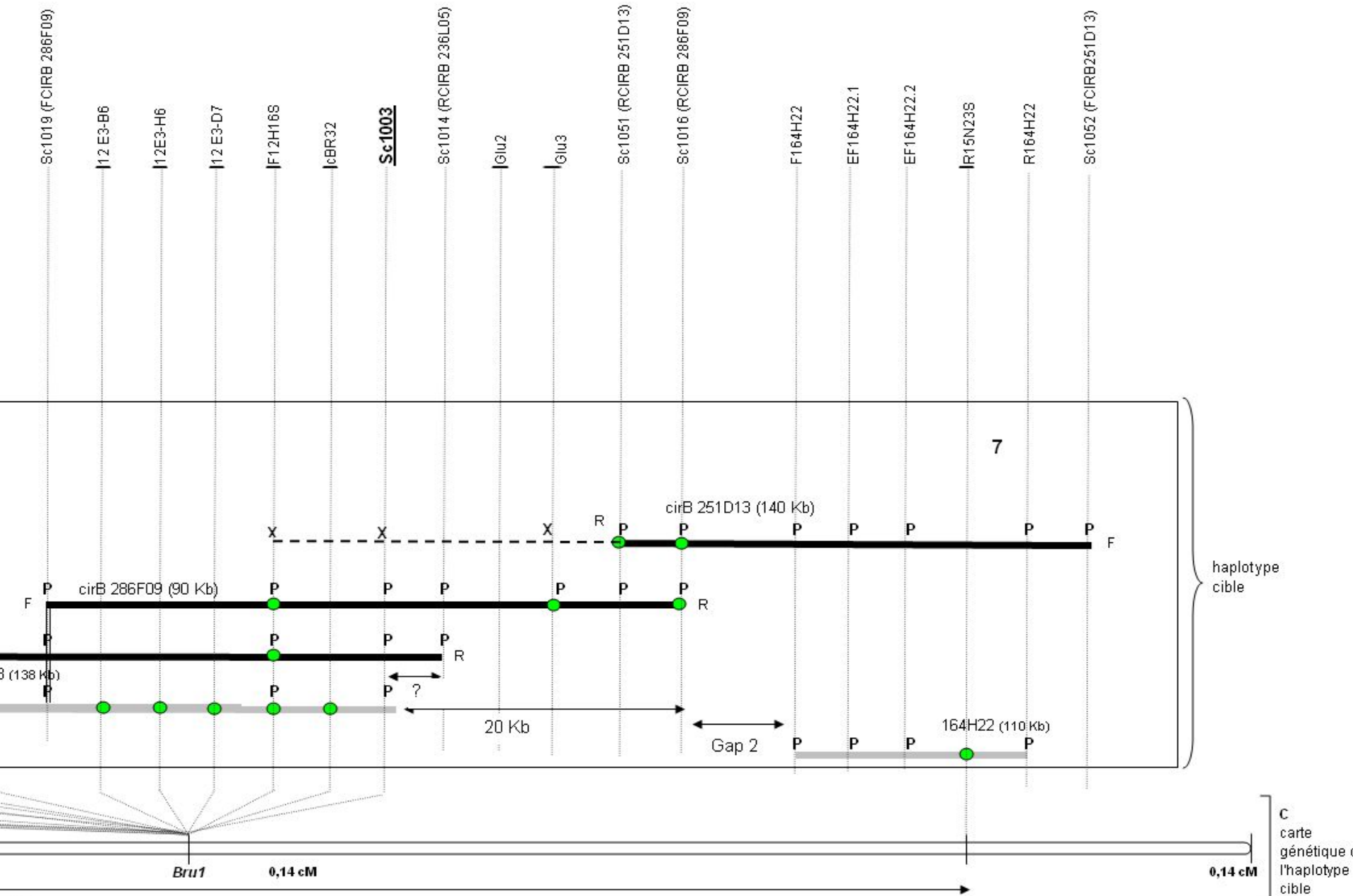


# Marche sur chromosome

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France

## Région où s'aligne la Sc1002, Sc1012 et Sc1032

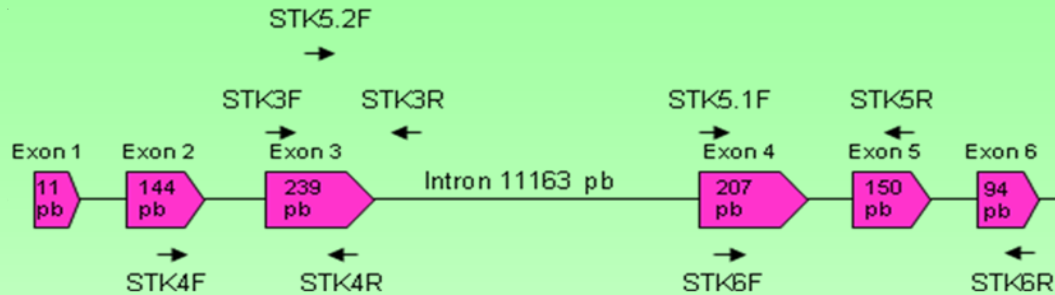




# Test du gène candidat

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France

- Définition de 5 couples d'amorce spécifiques.

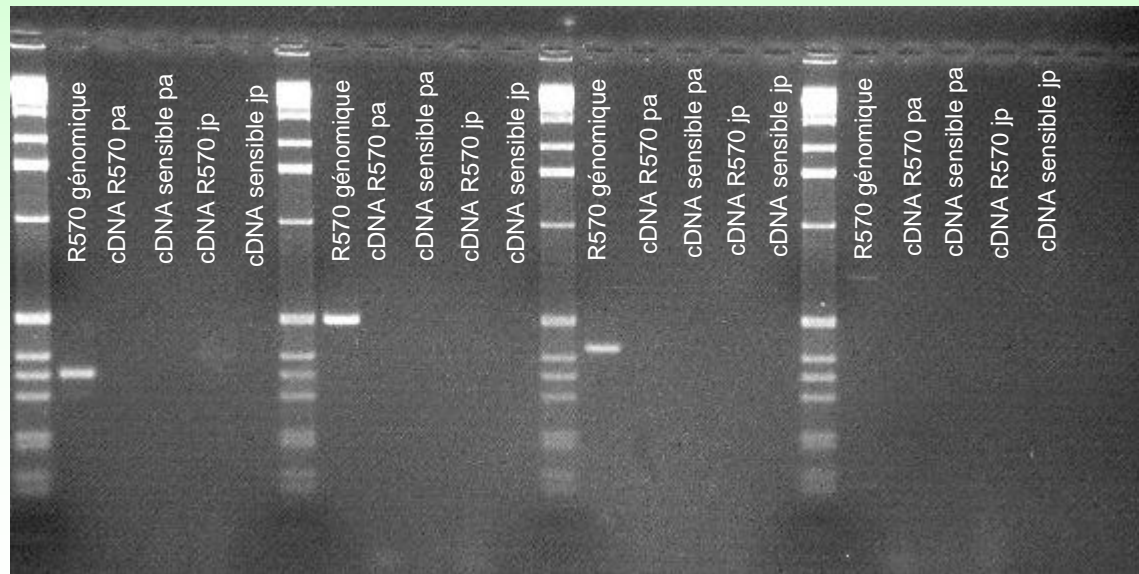


- Extraction d'ARN puis RT-PCR.
- Gène de référence : Actine

- Résultats avec les couples d'amorces spécifiques.



← Taille attendue pour cDNA



STK3 (347 pb)

STK4 (504 pb)  
CDS : 297 pb

STK5.1(413pb)  
CDS : 312 pb

STK5.2 (11810 pb)  
CDS : 447 pb

- **Conclusion**

- Amplification sur ADN génomique à la taille attendue.
- Pas d'amplification sur les cDNA.
- Collaboration avec un laboratoire Australien : transformation de canne à sucre sensible pour tester notre gène candidat.

- **Gène *Rpg1* :**

- Identifié dans une banque de 500 000 clones de cDNA : 3 clones correspondaient à *Rpg1*.
- Exprimé constitutivement dans l'orge mais à un faible niveau d'expression.



- . R570 = cultivars modernes de canne à sucre
- . Hybride entre *S. officinarum* et *S. spontaneum*.

. **Hypothèse testée : l'insertion proviendrait de *S. spontaneum***

. Criblage d'une collection de clones de *Saccharum* avec deux marqueurs PCR diagnostiques (9O20D11/RsaI, R12H16) :

- 72 clones *S. officinarum*. Espèce domestiquée
  - 31 clones *S. spontaneum*. Espèce sauvage
  - 14 clones *S. robustum*. Espèce sauvage
- 10 clones *S. barberi*. Hybride naturel entre *S. officinarum* et *S. spontaneum*.
  - 8 cultivars modernes.

# Origine de l'insertion

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France

	S.officinarum	S. spontaneum	S. robustum	S.barberi	cultivars hybrides
Nombre d'accessions	72	31	14	10	8
Présence des marqueurs 9O20D11/Rsa1 et R12H16	13%*	13%	14%	80%	43%

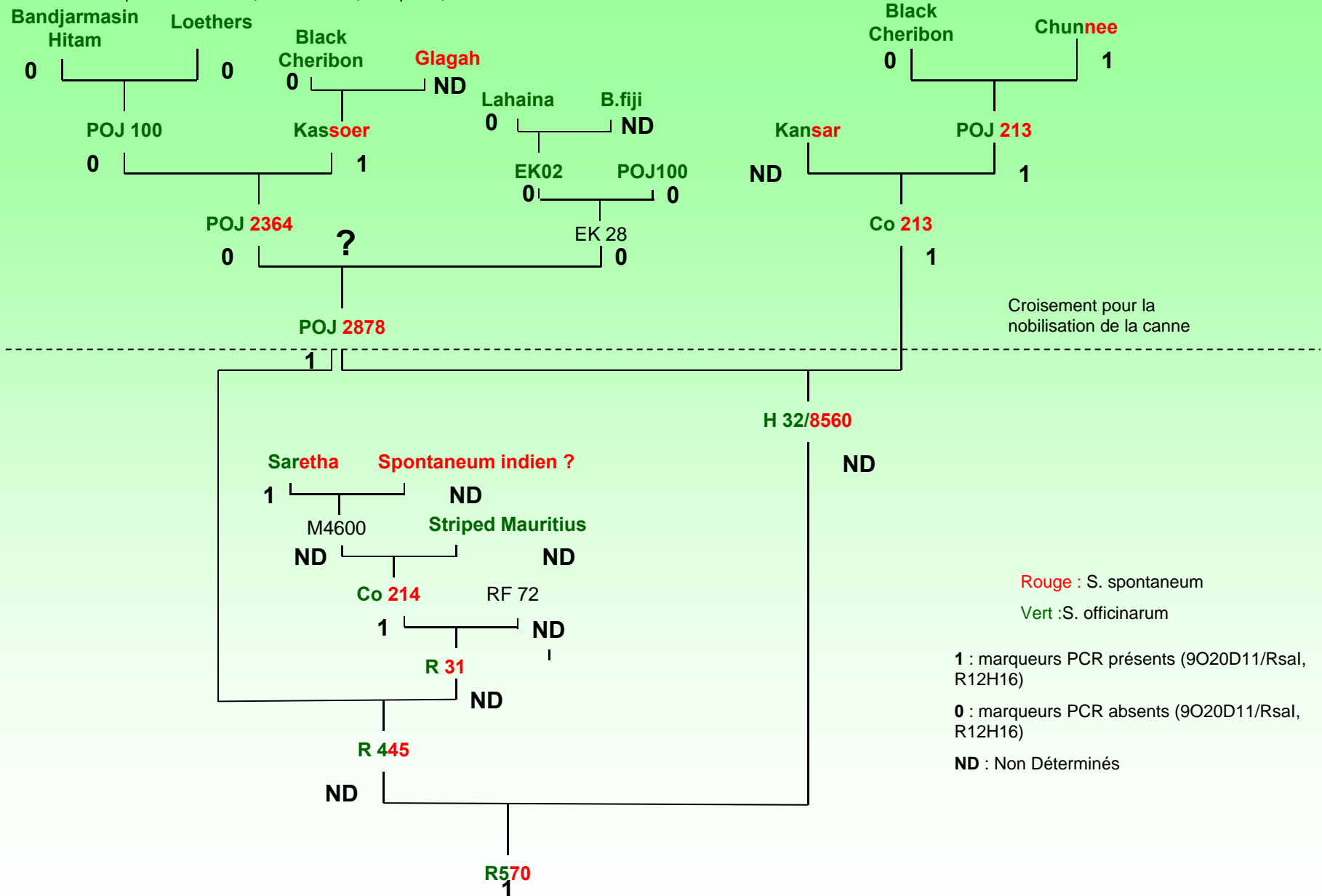
\* Présence de *S. officinarum* non pure dans la collection (Jannoo *et al*, 2007. TAG).

- moitié des clones présentant les marqueurs : 5 clones sur 10.

**Pour *officinarum*, 8 % des clones présentent les deux marqueurs.**

# Origine de l'insertion

Journées Génétique Canne à Sucre, 1-2 avril 2010, Montpellier, France



Les résultats ne nous permettent pas de réfuter ou de confirmer notre hypothèse